

《様式B》

研究テーマ 「作物栽培環境制御のための遅延発光を用いた新規光合成活性測定システムの構築」

研究責任者 所属機関名 静岡大学 学術院 農学領域
官職又は役職 教授・副学長

氏名 本橋 令子 メールアドレス motohashi.reiko@shizuoka.ac.jp

共同研究者 所属機関名 浜松ホトニクス株式会社 中央研究所 第8研究室
官職又は役職 部員

氏名 竹内 彩乃

共同研究者 所属機関名 浜松ホトニクス株式会社 中央研究所 第8研究室
官職又は役職 主任部員

氏名 勝又 政和

共同研究者 所属機関名 静岡大学 学術院 農学領域
官職又は役職 教授

氏名 切岩 祥和

(平成27年度募集) 第28回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

モデル植物であるシロイヌナズナはほとんどの遺伝子の破壊株が整備され、ゲノム情報も集積し、栽培も簡単で、植物体サイズも小さく、一度に複数の実験が可能である。シロイヌナズナの葉緑体には、3500以上のタンパク質が存在しているが、我々は葉緑体への局在が予測されたタンパク質の遺伝子破壊株を整備し、約2500ラインを保有している。我々はPAM蛍光法 (pulse amplitude modulated fluorometry) を用いて、葉緑体タンパク質の破壊株の中から光合成 (光化学系 II 反応の量子収率) に関与するタンパク質の探索を行ない、多くの変異体が単離できたが、その多くがすでに論文として公表されているものであった。しかし、我々は2500の葉緑体タンパク質遺伝子破壊株の遅延発光 (蛍光) を測定し、野生型と異なる遅延発光減衰波形を示す葉緑体タンパク質遺伝子破壊株をスクリーニングした結果、25変異株を得ることができた。得られた変

異体の一部は野生型よりも生育が遅く、植物体のサイズが小さかったが、多くは野生型と表現型の違いは観察されず、表現型に表れない植物の生理的な変化を遅延発光によって検出できることが示された。25 の遺伝子破壊株の原因遺伝子と遅延発光減衰波形の類似性から、遅延発光の異常を遺伝子に結び付けることが可能であることもわかった。変異体の遅延発光減衰波形は大きく 4 タイプのグループに分けられ、各グループの原因遺伝子の機能の共通性が確認でき、最も大きなグループの原因遺伝子の機能は、NDH 複合体(NADH dehydrogenase-like complex)や NDH 構成するタンパク質 RNA の編集やフェレドキシン (Fd) を含む循環的電子伝達経路に関するものであった。既存の PAM 蛍光法では主に PSII からリニア反応と NPQ(non-photochemical quenching)を観察する為に発達した。この PAM 発光法では観察が難しいカルビン・ベンソンサイクル(SBPase、FBA2)の変異体の遅延発光減衰波形の影響も検出する事ができた。また、2 成分法により減衰波形を解析した場合、循環的電子伝達経路という類似の機能を持つ (NDH、 Fd) タンパク質の遺伝子破壊株は、遅延発光減衰波形が類似していることが示された。さらに、強光条件下で栽培した遺伝子破壊株の遅延発光も測定し、強光条件下でのみ、遅延発光減衰曲線に変化が生じる変異体もスクリーニングする事ができた。

産業技術として実用化の可能性を検証するために、JST A-STEP 機能検証フェーズに申請を予定している。

2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内) 研究内容

A. モデル植物であるシロイヌナズナはほとんどの遺伝子の破壊株が整備され、ゲノム情報も集積し、栽培も簡単で、植物体サイズも小さく、一度に複数の実験が可能である。シロイヌナズナの葉緑体には、3500以上のタンパク質が存在しているが、我々は葉緑体への局在が予測されたタンパク質の遺伝子破壊株を整備し、約2500ラインを保有している。我々は遅延発光測定法を用いて、葉緑体タンパク質の破壊株の中から光合成に関与するタンパク質の探索を行ない、多くの変異体が単離した。

方法

1. シロイヌナズナの約 2500 ラインの葉緑体タンパク質遺伝子破壊系統を野生型と同条件 (1/2MS 培地に無菌播種し、2 週間、22℃、16 時間明期/8 時間暗期、照度約 4,000 ルクス) で栽培した。

2. 葉緑体タンパク質遺伝子破壊株の遅延発光を、浜松ホトニクス（株）PMX6100 を用いて、温度：22℃、Excitation wavelength:700nm、測定時間 120 秒の条件で測定し、野生型と異なる発光減衰波形を示す遺伝子破壊株を探索した。

1 次スクリーニングとして各ライン 3 個体ずつ発光減衰波形を測定し、各ラインのバックグラウンド エコタイプ(野生型)の発光減衰波形と比較した。野生型は変異体((例)ライン:No. 192) の測定前(Nossen-1) 3 個体、測定後(Nossen-2) 3 個体と 2 回測定し、コントロールとして用いた。

1 次スクリーニングで発光減衰波形の違いが観察されたラインは、再度、植物体を播種、栽培した。再現性を確認するために、発光減衰波形を 10 個体測定し、野生型と比較した。

3. 類似の発光減衰波形を示す遺伝子破壊株をグループ分けし、各グループの遺伝子機能の共通性を探った。既に機能が解明されている葉緑体タンパク質遺伝子破壊株によって、発光減衰波形の意味付けを行った。

4. 葉緑体タンパク質の機能グループ数が少なかったため、遅延発光の測定条件を検討した。2 の実験により野生型と変わらない発光減衰波形を示す遺伝子破壊株を強光条件下で 1 日栽培した場合の遅延発光減衰波形を観察した。

B. 遅延発光を用いた光合成機能センシングが農作物の早期診断に有効であるか評価するために、栄養(N栄養欠乏)、塩ストレス処理したシロイヌナズナの遅延発光を測定し、ストレスによる生理的な変化を遅延発光により検出できるか検証した。

方法

10 日間通常の MS 培地で栽培したシロイヌナズナの幼苗を N 欠乏の MS 培地に移植し、経時的に遅延発光データを取得し、MS 培地で栽培したシロイヌナズナの遅延発光データと比較した。

シロイヌナズナを 14 日間、20mM、50mM NaCl 入り MS 培地にて栽培し、コントロールと遅延発光減衰波形の違いを観察した。

実験結果と考察

A. 核コード葉緑体タンパク質変異体から遅延発光変異体のスクリーニング

我々は 2500 の葉緑体タンパク質遺伝子破壊株の遅延発光を測定し、野生型と異なる遅延発光減衰波形を示す葉緑体タンパク質遺伝子破壊株をスクリーニングした結果、25 変異株を得ることができた。得られた変異体の一部は野生型よりも生育が遅く、植物体の

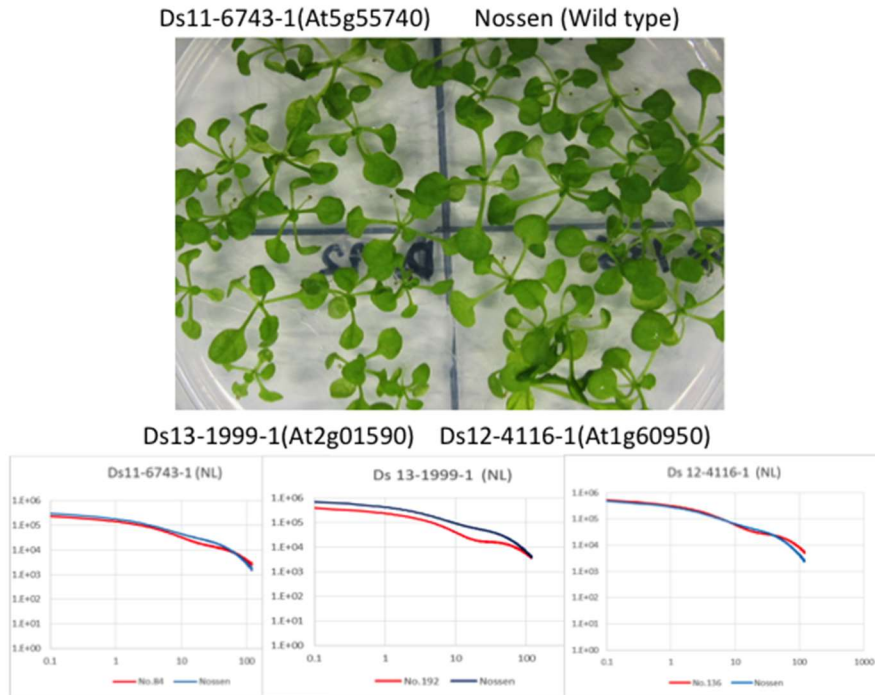


図1 3つの遅延発光変異体とその遅延発光減衰波形
赤線が変異体、青線が野生型の遅延発光減衰波形

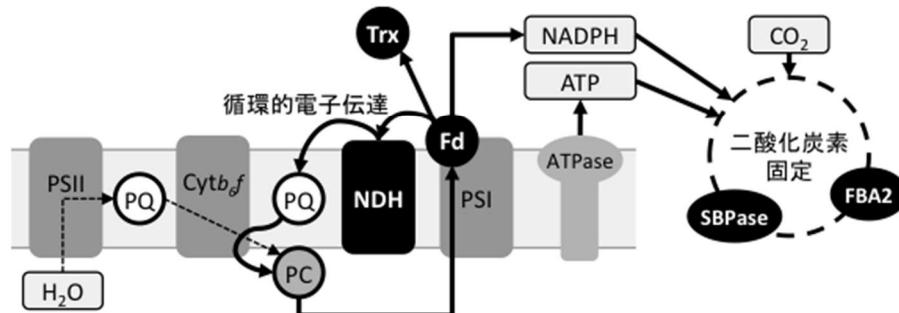


図2 遅延発光に影響を与える光合成経路
黒塗り白字が得られた変異体の原因タンパク質を示す

サイズが小さかったが、多くは野生型と表現型の違いは観察されず、表現型に表れない植物の生理的な変化を遅延発光によって検出できることが示された (図1)。25 の遺伝子破壊株の原因遺伝子と遅延発光減衰波形の類似性から、遅延発光の異常を遺伝子に結び付けることが可能であることもわかった。変異体の遅延発光減衰波形は大きく 4 夕

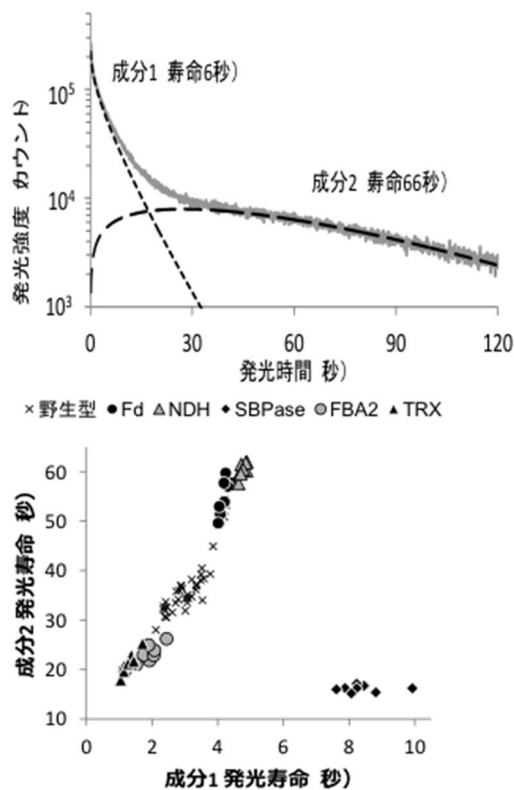


図3 遅延発光の減衰波形の評価例(二成分法)

達した。このPAM蛍光法では観察が難しいカルビン・ベンソンサイクル(SBPase、FBA2)の変異体の遅延発光減衰波形の影響も検出する事ができた(図3)。また、図3に示すように、2成分法により減衰波形を解析した場合、循環的電子伝達経路という類似の機能を持つ(NDH、Fd)タンパク質の遺伝子破壊株は、遅延発光減衰波形が類似していることが示された(図3の下図)。さらに、強光条件下で栽培した遺伝子破壊株の遅延発光も測定し、強光条件下でのみ、遅延発光減衰曲線に変化が生じる変異体もスクリーニングする事ができた。

B. 遅延発光を用いた光合成機能センシングが農作物の早期診断に有効であるか評価するために、栄養(N栄養欠乏)、塩ストレス処理したシロイヌナズナの遅延発光を測定した

現在までに、シロイヌナズナやコマツナにおいて、遅延発光によってN欠乏の影響を再現性をともなって検出した。N欠乏の予備実験から10日間通常のMS培地にシロイヌナズナを播種し、16時間・明期/8時間・暗期、22度で栽培し、その後、N欠乏のMS培地に移植後、経時的(1日~5日)に遅延発光計測した結果、無処理との遅延発光減衰波形の違いを観察した(図4)。図4は、減衰波形を二つの発光成分に分けて、その発光成分から発光寿命を計算した。一つの減衰波形から、早い減衰の寿命、遅い減衰の

タイプのグループに分けられ、各グループの原因遺伝子の機能の共通性が確認でき、最も大きなグループの原因遺伝子の機能は、NDH複合体(NADH dehydrogenase-like complex)やNDH構成するタンパク質RNAの編集やフェレドキシン(Fd)を含む循環的電子伝達経路に関するものであった(図2の黒塗白文字タンパク質、図3)。既存のPAM蛍光法では主にPSIIからリニア反応(図2の点線)とNPQ(non-photochemical quenching)を観察する為に発

寿命の二つの値 (ev1、ev2) が得られる。遅い減衰成分 (ev2) において、N 欠乏に有意な差が検出された。最も収量に影響を与える N 欠乏の生理的変化を遅延発光によりモニタリングできた事は、この技術を用いた栽培管理への有効性を示す。測定期間を 5 日としたのは、N 欠乏条件下で栽培すると 5 日目くらいから目視で影響が観察され始めるためである。

さらに、シロイヌナズナを 14 日間、20mM、50mM NaCl 入り MS 培地にて栽培した結果、コントロールと遅延発光減衰波形の違いが観察された。今後、20mM 以下の塩濃度下で栽培したシロイヌナズナの遅延発光データを取得し、光合成表現型に影響がでる塩濃度を調べる。また、生育ステージ (10 日植物、21 日植物、花芽形成植物) 別に塩 (100 ~150mM NaCl) 処理し、経時的に遅延発光データを取得し、光合成表現型に影響がでる塩濃度、期間を調べる。

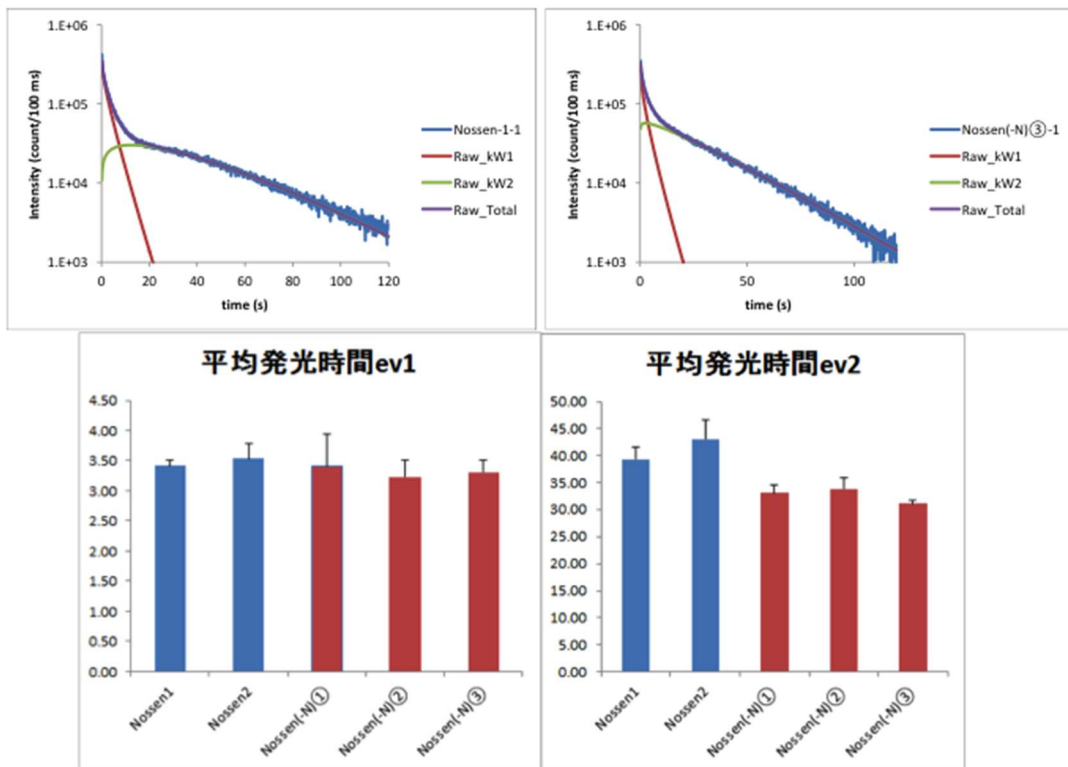


図4 N欠乏による遅延発光の影響分析
青が通常栽培、赤がN欠乏栽培シロイヌナズナの遅延発光寿命データ